Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 4, Oct- Nov 2019, p. 453-463

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 4، مهر - آبان 1398، ص. 463-453

بررسی ویژگی‌های مکانیکی، فیزیکی و ضدمیکروبی فیلم ژلاتینی حاوی هیدروسل استخراجی زردچوبه (*Curcuma longa*)

زهره دیدار*

تاریخ دریافت: 1397/06/04
تاریخ پذیرش: 1398/01/25

چکیده

ژلاتین از جمله ترکیبات متداول در تهیه بسته بندی های خوراکی است. در این پژوهش استفاده از درصدهای مختلف (%100-5) هیدروسل استخراجی زردچوبه در فرمولاسیون تهیه فیلم خوراکی ژلاتینی مورد بررسی قرار گرفت. ویژگی‌های فیزیکی شامل درصد عبور نور، میزان نفوذ پذیری نسبت به بخار آب، طیف سنجی مادون قرمز فوریه، تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی، مقاومت به کشش و درصد طویل شدن در فیلم‌های تولید شده، بررسی گردید. ویژگی‌های ضدمیکروبی بر سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نیز بررسی شد. استفاده از هیدروسل استخراجی زردچوبه سبب افزایش میزان ممانعت نسبت به اشعه ماوراء بنفش و کاهش شفافیت فیلم خوراکی گردید ($p≤0/01$). میزان مقاومت به کشش با افزودن هیدروسل در فرمولاسیون فیلم خوراکی افزایش ولی درصد طویل شدن فیلم خوراکی کاهش نشان داد به طوری که میزان مقاومت در برابر تنش کششی در نمونه شاهد 19/3 مگاپاسکال و در نمونه حاوی 100٪ هیدروسل، 33/3 مگا پاسکال اندازه‌گیری شد. درصد افزایش طول نیز در نمونه شاهد180% و در نمونه حاوی هیدروسل برابر با 96٪ بود. افزودن درصدهای مختلف هیدروسل سبب افزایش نفوذ پذیری نسبت به بخار آب شد ($p≤0/01$). بررسی اثر ضد میکروبی نیز نشان داد که افزودن هیدروسل به فرمولاسیون فیلم خوراکی سبب ایجاد فعالیت ضد میکروبی در برابر *استافیلوکوکوس‌های* مورد مطالعه گردید که بیشترین حساسیت در مورد *اورئوس* و *ساپروفیتیکوس* مشاهده شد (قطر هاله عدم رشد برابر با 37 میلی متر). مطابق نتایج حاصله از این پژوهش، افزودن هیدروسل زردچوبه به فرمولاسیون فیلم ژلاتینی، سبب ایجاد خاصیت ضد میکروبی در برابر سویه‌های باکتری *استافیلوکوکوس* می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: فیلم ژلاتینی، هیدروسل، زردچوبه، بسته بندی، اثر ضد میکروبی

مقدمه

افزایش مشکلات زیست‌محیطی ناشی از بسته‌بندی‌های پلاستیکی منجر به کاربرد روز افزون تهیه بسته‌بندی‌های خوراکی گردیده است (Tongnuanchan *et al*., 2016). ژلاتین از جمله ترکیباتی است که برای تهیه فیلم‌های خوراکی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد که علت آن ویژگی‌هایی نظیر خاصیت ممانعت‌کنندگی در برابر گازها، ترکیبات فرّار و اشعه ماوراءبنفش است (Tongnuanchan *et al*., 2014). یکی از ویژگی‌های مهم بسته‌بندی‌ها، محافظت مواد غذایی در برابر آلودگی‌های ضدمیکروبی است، لذا به‌منظور افزایش این ویژگی، امروزه بسته‌بندی‌هایی با خواص ضدمیکروبی مورد بررسی قرار می‌گیرند (Wu *et al*., 2017) از جمله افزودن ترکیبات مختلف با اثر ضدمیکروبی در بسته‌بندی‌های خوراکی نظیر اسانس‌های گیاهی مانند دارچین در فرمولاسیون فیلم ژلاتینی (Wu *et al*., 2017; kim *et al*., 2018)، اسانس سنبل هندی و ریحان در فیلم ژلاتینی (Tongnuanchan *et al*.,2014)، اسانس برگ پرتغال در فیلم ژلاتینی (Alparslan *et al*., 2016)، روغن میخک به فیلم پکتینی (Nisar *et al*., 2018)، اسانس دارچین به فیلم خوراکی پلی‌ساکاریدهای سویا (Ghani *et a*l., 2018)، اسانس نعناع دشتی به فیلم خوراکی کربوکسی‌متیل سلولز و کیتوزان (Shahbazi *et al*., 2018)، اسانس اسطوخودوس به فیلم خوراکی نشاسته (Jamróz *et al*., 2018)، اسانس آویشن و اسطوخودوس به فیلم خوراکی ژلاتینی (Martucci *et al*., 2015). هیدروسل محصول فرعی استخراج اسانس‌های روغنی از گیاهان معطر است. هیدروسل‌ها حاوی میزان اندکی اسانس روغنی هستند (کمتراز 1 گرم در لیتر) و حاوی ترکیبات محلول در آب هستند (Labaddie *et al*., 2016). هیدروسل‌ها همچنین در شرایط مناسب نگهداری ماندگاری زیادی دارند (بیش از یک سال). پژوهش‌های مختلفی اثر ضدمیکروبی و

1- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد نیشابور
(* - نویسنده مسئول: Email: zdidar57@gmail.com)

DOI: 10.22067/ifstrj.v15i4.74964

ضدکپکی هیدروسل‌ها را نشان داده است (D'Amato *et al*., 2018). تحقیق Shen و همکاران (2017) اثر ضدمیکروبی هیدروسل استخراجی از گیاه نخل آرکا در برابر *اشرشیا کلی*، *کاندیدا آلبیکانس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان داده است (Shen *et al*., 2017). Ozturk و همکاران (2016) اثر ضدمیکروبی هیدروسل رزماری در برابر *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشرشیاکلی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* را نشان داده‌اند. اثر ضدکپکی (Belabbes *et al*., 2017) و ضدویروسی (Kaewprom *et al*., 2017) هیدروسل‌های مختلف گیاهی نیز گزارش شده است.

زردچوبه از خانواده زنجبیل با نام علمی *Curcuma longa* است. قسمت مورد استفاده غذایی و دارویی این گیاه ریزوم‌های خشک شده آن است. وجود انواع ترکیبات مؤثره ریزوم گیاه زردچوبه از جمله کورکومین، روغن‌های فرّار، زینجیرن، آلفا و بتا تورمرین و کربوهیدرات‌هایی نظیر آرابینوز، فروکتوز، گلوکز و نشاسته مشخص گردیده است. اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، محافظت کبد، ضدالتهابی، کاهش سطح کلسترول خون، بهبود اختلالات گوارشی، کاهش سطح گلوکز خون، کاهش بروز آلزایمر از طریق کاهش تجمع پروتئین بتاآمیلوئید در مغز از جمله اثرات مفید مصرف زردچوبه است (فلاح حسینی و همکاران، 1388). بررسی‌هایی در خصوص تهیه فیلم‌های خوراکی حاوی عصاره زردچوبه صورت گرفته است از جمله افزودن عصاره زردچوبه در فرمولاسیون فیلم خوراکی نشاسته (Silveira Hornung *et al*, 2018)، اما اثر افزودن هیدروسل گیاهی در فرمولاسیون فیلم‌های خوراکی مورد بررسی قرار نگرفته است. هدف از انجام این پژوهش بررسی استفاده از هیدروسل استخراجی زردچوبه در فرمولاسیون فیلم ژلاتینی و بررسی خواص مکانیکی، فیزیکی و ضدمیکروبی فیلم حاصله بود.

مواد و روش‌ها

استخراج هیدروسل

جهت استخراج هیدروسل، زردچوبه (*Curcuma longa*) از بازار محلی نیشابور تهیه شد. استخراج هیدروسل بدین صورت انجام شد: 100 گرم از هر کدام آسیاب شده در فلاکس 2 لیتری دارای 1 لیتر آب (1:10 وزنی/ حجمی) برای مدت 2 ساعت توسط دستگاه کلونجر حرارت داده شده و عمل تقطیر با بخار انجام شد. پس از خاتمه، اسانس روغنی جداسازی گردید و هیدروسل حاصله در بطری استریل در دمای 4 درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده قرار داده شد.

آماده‌سازی سویه‌های میکروبی

سویه‌های میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* (PTCC 1440)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (PTCC 1435) به‌صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. ویال باکتریایی در شرایط استریل، شکسته شده و به محیط کشت مناسب تریپتوز سوی براث در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* و نوترینت براث در مورد *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*) منتقل گردید و برای مدت 24 ساعت در دمای37 درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری شد. سلول‌های میکروبی توسط سانتریفوژ (ALC4232) با دور 4000rpm جدا شدند. سپس توسط روش مک فارلند جمعیت باکتریایی تعیین شد (میزان دانسیته نوری در طول موج625 نانومتر برابر با 0/13 -0/08 بود که معادل با نیم مک فارلند و جمعیت تقریبی $1/5\times10^{8}$ باکتری در میلی‌لیتر بود) (محمدی و همکاران، 1394). سپس با رقیق‌سازی به نسبت 01/ توسط سرم فیزیولوژی استریل، کدورت$1/5\times10^{6}$ باکتری در هر میلی‌لیتر به‌دست آمد (مرادیان ایوری و همکاران، 1394).

تهیه فیلم ژلاتینی

تهیه فیلم ژلاتینی به روش قالب‌گیری انجام شد. ژلاتین با غلظت 4% در آب مقطر با دمای 45 درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان 30 دقیقه حل شد. سپس گلیسرول با غلظت 25 درصد وزنی- وزنی ژلاتین به محلول اضافه شد. هیدروسل با غلظت‌های 5، 30، 50، 80 و 100% جایگزین آب مصرفی گردید. به‌منظور حذف حباب‌های هوا در محلول تهیه شده از دستگاه اولتراسونیک (Eurosonic) به مدت 5 دقیقه استفاده شد و سپس میزان 10 میلی‌لیتر از محلول تهیه شده داخل قالب با ابعاد 120×80 میلی‌متر ریخته شد و در دمای 22 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 50 درصد به مدت 48 ساعت خشک گردید. پس از مرحله خشک کردن، قطعات فیلم ژلاتینی تهیه شده داخل دسیکاتور با دمای 22 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 50 درصد برای مدت 3 روز قبل از انجام آنالیزهای مختلف قرار داده شد (Wu *et al*., 2017).

بررسی خصوصیات بافتی فیلم ژلاتینی

بررسی خصوصیات بافتی فیلم‌های ژلاتینی با استفاده از دستگاه بافت‌سنج (TA-XT plus، انگلستان) و به کمک نرم‌افزار Exponent صورت گرفت (ASTM- D882, 2001). فیلم ژلاتینی در اندازه 20×60 میلی‌متر بریده شد. نمونه‌های فیلم در بین دو فک با سرعت 1 میلی‌متر در ثانیه کشیده شد. میزان تنش کششی و درصد طویل شدن(افزایش طول تا نقطه پارگی) مطابق فرمول‌های 1 و 2 محاسبه شد.

$$\text{تنش کششی (مگا پاسکال)} = \frac{\text{حداکثر نیروی لازم برای پاره شدن فیلم حسب بر نیوتن}}{\text{سطح اولیه بر حسب متر مربع}} \qquad (1)$$

(2) $\text{درصد طویل شدن فیلم} = \frac{\text{اختلاف طول هنگام پاره شدن بر حسب متر}}{\text{طول اولیه حسب بر متر}}$

بررسی میزان نفوذپذیری به بخار آب فیلم ژلاتینی

نفوذپذیری نسبت به بخار آب با روش وزن‌سنجی انجام شد (ASTM- E96-95, 1995). در یک ظرف 14 میلی‌لیتری، 10 میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و توسط فیلم‌های ژلاتینی مورد بررسی با مساحت 1/5 سانتی‌متر مربع دربندی شد. بطری دربندی شده ابتدا توزین گردید و در محفظه دارای سیلیکاژل با میزان رطوبت نسبی و دمای مشخص قرار گرفت. هر 12 ساعت و به مدت 3 روز توزین ظرف انجام شد. سپس نمودار تغییرات وزن ظرف در برابر زمان رسم شد، شیب آن محاسبه و میزان نفوذپذیری نسبت به رطوبت با فرمول 3 محاسبه شد.

$$WVP(gm^{-1}pa^{-1}s^{-1})=\frac{(W\times X)}{A\times t\times \Delta P} \quad (3)$$

W میزان اختلاف وزن بطری، X ضخامت فیلم ژلاتینی، A مساحت فیلم ژلاتینی بر حسب متر مربع، t زمان بر حسب ثانیه و Δp اختلاف فشار بخار اتمسفر حاوی سیلیکاژل و آب خالص است.

بررسی میزان ضخامت فیلم ژلاتینی

ضخامت فیلم‌های ژلاتینی توسط میکرومتر دیجیتال صفر- 25 Guanglu (211-701) انجام شد. از هشت نقطه از فیلم ضخامت تعیین شد و میانگین اعداد به‌عنوان ضخامت فیلم در نظر گرفته شد.

بررسی میزان عبور نور فیلم ژلاتینی

بررسی میزان عبور نور فیلم‌های ژلاتینی از روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (ژنوی 6305) انجام شد (Tongnuanchan *et al*., 2012). بدین صورت که عبور نور در ناحیه طول موج‌های مرئی و ماوراء بنفش (200 تا 800 نانومتر) اندازه‌گیری شد. قطعات فیلم ژلاتینی به‌صورت مستطیل شکل بریده شد و مستقیماً داخل سل دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد. سل خالی به‌عنوان کنترل استفاده شد. نتایج آزمون به‌صورت درصد عبور نور ثبت گردید. جهت محاسبه میزان کدورت فیلمها از رابطه زیر استفاده شد:

(4) ضخامت فیلم/ میزان جذب در طول موج 600 نانومتر = کدورت

بررسی خصوصیات ضد میکروبی فیلم ژلاتینی

جهت بررسی خصوصیات ضدمیکروبی از روش Martucci و همکاران (2015) استفاده گردید. ابتدا مقدار 0/1 میلی‌لیتر از میکروارگانیسم‌های مورد نظر شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* با جمعیت تقریبی 10^6× 1/5 به محیط کشت جامد شامل تریپتوز سوی آگار و نوترینت آگار منتقل شد. قطعات 12 میلی‌متری از فیلم ژلاتین بریده شده و روی محیط کشت قرار داده شد. گرمخانه‌گذاری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 50% برای مدت 24 ساعت صورت گرفت. قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه گیری شد. تمام آزمون‌ها در سه تکرار انجام گردید.

طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

طیف مادون قرمز تبدیل فوریه توسط دستگاه Perkin-Elmer مدل Spectroma2 در دامنه فرکانس cm^{-1} 4500-4000 ثبت شد (Sharma *et al*., 2015).

تصویربرداری میکروسکوپی روبشی

به‌منظور بررسی مورفولوژی سطح فیلم‌های ژلاتینی از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل phenom proX با بزرگنمایی 30000-10000 صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت. آنالیزهای آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار STATISTICA نسخه 13 انجام شد. میانگین تیمارها به روش دانکن در سطح اطمینان 99 درصد مقایسه گردیدند. برای رسم شکل‌ها از نرم‌افزار اکسل 2010 استفاده شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی

ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های ژلاتینی در جدول1، نشان داده شده است. بررسی‌ها نشان داد افزودن هیدروسل استخراجی زردچوبه به فرمولاسیون فیلم ژلاتینی سبب تغییرات قابل توجه در ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم ژلاتینی گردید ($p\leq0/01$).

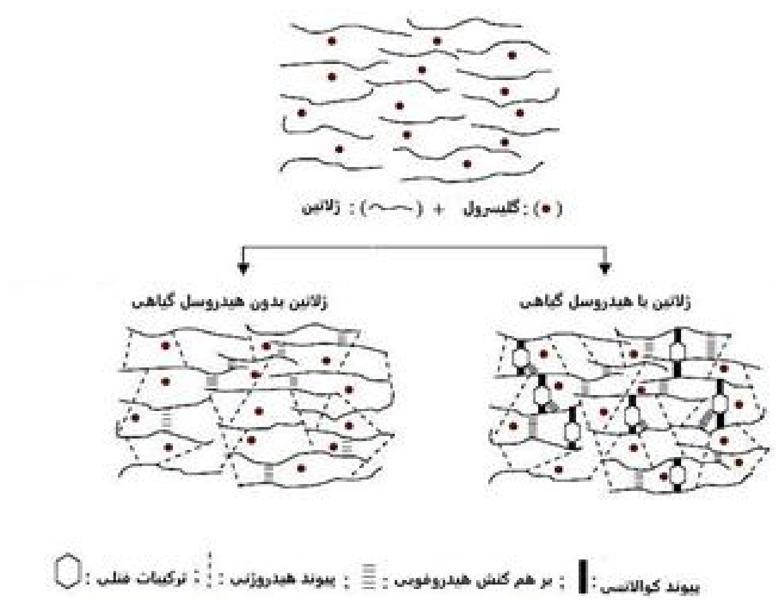
نفوذپذیری نسبت به بخار آب

نتایج مربوط به میزان نفوذپذیری فیلم‌های ژلاتینی تهیه شده در جدول نشان داده شده است. استفاده از هیدروسل زردچوبه سبب کاهش میزان نفوذ پذیری فیلم ژلاتینی نسبت به نمونه شاهد گردید ($p\leq0/01$) البته تیمار حاوی 5% هیدروسل زردچوبه این اثر ناچیز بود (جدول 1). علت کاهش میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب در اثر افزودن عصاره‌های گیاهی به دلیل افزایش میزان پیوندهای جانبی ناشی از افزایش پیوندهای هیدروژنی و برهم کنش‌های هیدروفوبی است که سبب تشکیل شبکه‌ای در فیلم خوراکی با حجم آزاد ماتریکس پلیمری کمتر است که سبب کاهش میزان نفوذ پذیری نسبت به بخار آب می‌گردد (Sazedul Hoque *et al*., 2011).

جدول 1- ویژگی‌های مکانیکی و فیزیکی فیلم‌های ژلاتینی*

فیلم ژلاتینی حاوی هیدروسل زردچوبه	مقاومت در برابر کشش(MPa)	افزایش طول(٪)	نفوذ پذیری نسبت به بخار آب (10^{-10}g/m.pa.s)	ضخامت (mm)	میزان کدورت
نمونه شاهد	19/3±1/5 [f]	180±5/5 [a]	1/32±0/02[a]	0/11±0/02[a]	0/099±0/01[d]
%5	18/9±1 [e]	169±4/5 [b]	1/25±0/02[b]	0/1±0/02[a]	0/1±0/02[d]
%30	22/1±2/4 [d]	112±3/6 [c]	1/18±0/03[c]	0/095±0/05[b]	0/52±0/03[c]
%50	24/3±2/3 [c]	99±3 [d]	1/06±0/04[d]	0/078±0/03[c]	1/15±0/03[b]
%80	28/6± 2/6 [b]	97±3 [e]	0/94±0/02[e]	0/07±0/04[c]	1/57±0/05[a]
%100	33/3± 3/3 [a]	96±3 [e]	0/95 ±0/03[e]	0/06±0/02[d]	2±0/08[a]

*میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد هستند در آزمون چند دامنه دانکن هستند.



شکل 1- تصویر شماتیک اثر هیدروسل بر ویژگی‌های ساختاری ژلاتین و پیوندهای جانبی در ساختار ژلاتین و شبکه فیلم خوراکی

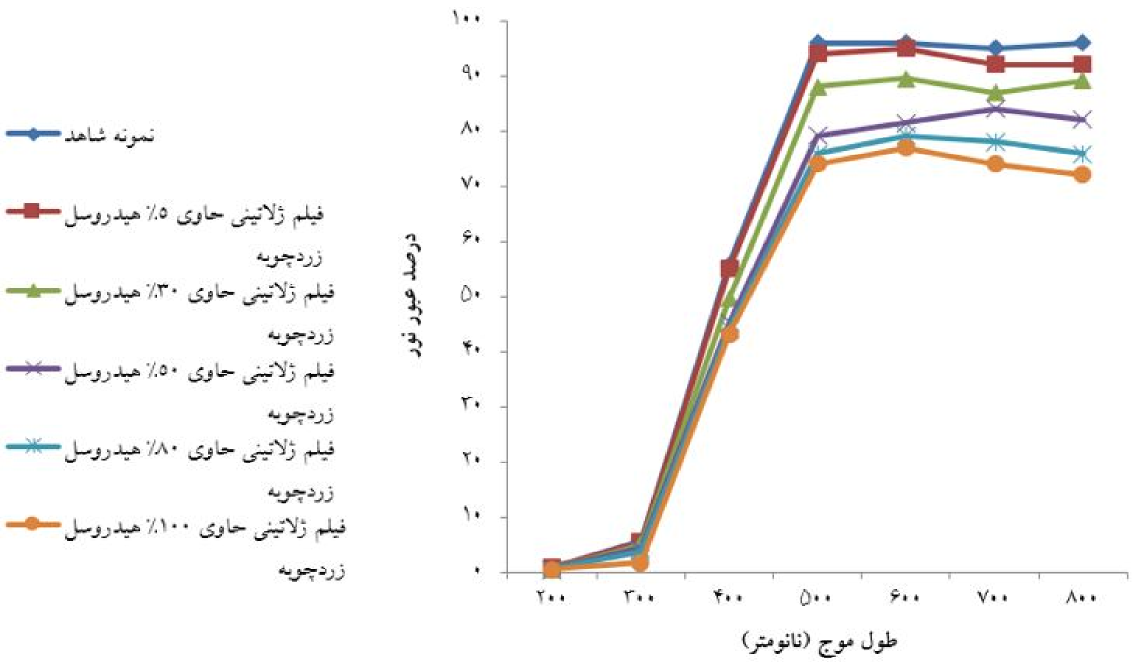
ضخامت فیلم‌های ژلاتینی

بررسی‌ها نشان داد با افزودن درصدهای مختلف هیدروسل زردچوبه به فرمولاسیون فیلم ژلاتینی، ضخامت کاهش می‌یابد که میزان کاهش، با درصد هیدروسل ارتباط مستقیم دارد ($p\leq0/01$). در مطالعات مربوط به افزودن اسانس‌های روغنی، افزایش ضخامت فیلم‌های ژلاتینی به علت متجانس نبودن ساختار لیپیدی اسانس‌ها با ساختار پروتئینی فیلم ژلاتینی، افزایش ضخامت فیلم‌های ژلاتینی حاوی اسانس‌های روغنی مشاهده شده است (Wu *et al.*, 2017) به علت محلول در آب بودن ترکیبات تشکیل‌دهنده هیدروسل، هنگام تهیه فیلم ژلاتینی به خوبی در ساختار فیلم ژلاتینی جایگزین می‌شوند و سبب کاهش ضخامت می‌گردند. Sazedul Hoque و همکاران(2011) در گزارش خود بیان نمودند افزودن عصاره‌های گیاهی مختلف به فرمولاسیون فیلم ژلاتینی، منجر به کاهش ضخامت فیلم حاصله گردیده است. علت کاهش ضخامت فیلم ژلاتینی در اثر افزودن هیدروسل زردچوبه را می‌توان به تشکیل انواع پیوندهای هیدروژنی و بر هم کنش‌های هیدروفوبی در این شرایط دانست که منجر به تشکیل شبکه فیلم خوراکی متراکم‌تر می‌شود در نتیجه کاهش ضخامت در فیلم ژلاتینی می‌گردد (شکل 1).

درصد عبور نور فیلم ژلاتینی

نتایج نشان داد استفاده از هیدروسل استخراجی زردچوبه در فرمولاسیون فیلم ژلاتینی سبب تغییر در میزان درصد عبور نور در طول موج‌های مختلف می‌گردد (شکل 2). در محدوده طول موج ماوراء بنفش 200-300 نانومتر میزان درصد عبور نور با افزودن هیدروسل به فرمولاسیون کاهش پیدا می‌کند که با توجه به این که بسته بندی‌هایی که ممانعت بیشتری نسبت به اشعه ماوراءبنفش دارند مانع از

فوتواکسیداسیون چربی‌ها می‌شوند و در نتیجه سبب افزایش ماندگاری محصولات غذایی می‌گردند لذا از این نظر افزودن هیدروسل به دلیل کم کردن درصد عبور نورماوراء بنفش از فیلم خوراکی تهیه شده مفید است. در طول موج‌های مرئی (600 -350 نانومتر) نیز افزودن هیدروسل استخراجی زردچوبه سبب کاهش درصد عبور نور شده است که نشان دهنده شفافیت بیشتر فیلم شاهد نسبت به نمونه‌های فیلم ژلاتینی حاوی هیدروسل است (شکل 2).



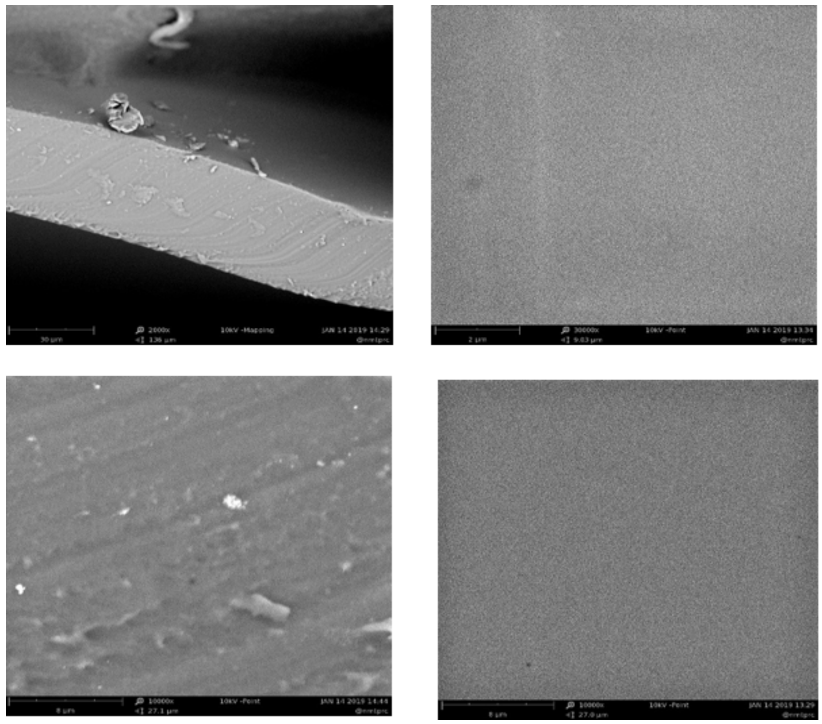
شکل 2- درصد عبور نور از فیلم‌های ژلاتینی در دامنه طول موج 800-200.

کدورت معیار دیگری جهت سنجش میزان شفافیت فیلم‌ها است. در واقع هرچه کدورت بیشتر باشد، شفافیت کمتر است. مقایسه میزان کدورت فیلم‌های ژلاتینی تولیدی نشان داد در فیلم های حاوی هیدروسل ،کدورت بیشتر و در واقع شفافیت کمتر است. البته در مقدار 5% افزودن هیدروسل زردچوبه به فرمولاسیون فیلم ژلاتینی، میزان کدورت تفاوت معنی داری با نمونه شاهد نداشت ولی در غلظت‌های بیشتر، کدورت افزایش پیدا نمود (جدول 1). افزودن اسانس‌های گیاهی به دلیل وجود قطرات چربی سبب ناهمگن شدن بافت فیلم‌های خوراکی و در نتیجه سبب پراکنش نور و کاهش شفافیت در این گونه فیلم‌های خوراکی می‌گردد. در مورد هیدروسل های گیاهی به علت ماهیت محلول در آب و عدم وجود چربی، تغییر در شفافیت کمتر رخ می‌دهد. البته نمونه‌های حاوی هیدروسل نسبت به نمونه شاهد شفافیت کمتری دارند که به علت وجود ترکیبات مختلف از جمله در هیدروسل‌های گیاهی است (Labaddie *et al*., 2016).

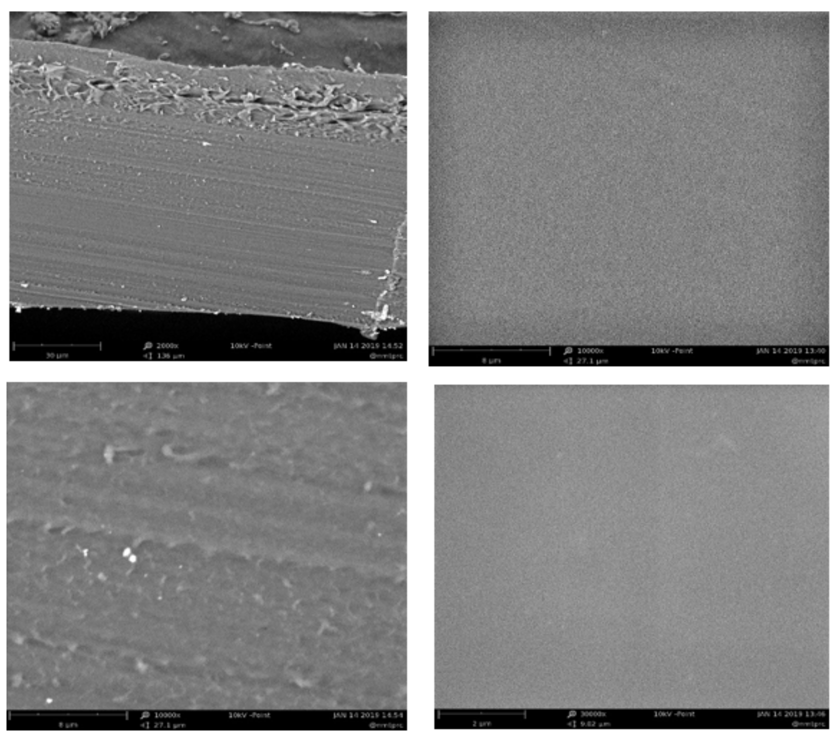
تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی

شکل‌های 3 و 4 تصاویر میکروسکوپ روبشی در بزرگنمایی 10000 و 30000 ربوط به فیلم‌های ژلاتینی را نشان می‌دهد. بررسی این تصاویر، نشان داد که در هر دو نمونه (نمونه شاهد و نمونه حاوی 100% هیدروسل زردچوبه) بافت همگن و یکنواختی وجود دارد. در واقع افزودن هیدروسل زردچوبه به فرمولاسیون فیلم ژلاتینی اثری بر یکنواختی بافت نداشته است. بررسی مقطع عرضی فیلم‌ها نیز مؤید این مطلب است.

ماهیت محلول در آب بودن هیدروسل سبب می‌شود افزودن هیدروسل در ساختار فیلم ژلاتینی یکنواختی بافت فیلم را به‌طور چشمگیری تحت تأثیر قرار ندهد در حالی که استفاده از اسانس‌های گیاهی، سبب تغییرات قابل توجهی در ساختار فیلم‌های خوراکی می‌گردد. مطابق گزارش استفاده از اسانس زنجبیل در فرمولاسیون فیلم خوراکی ژلاتین/ کیتوزان سبب ایجاد غیریکنواختی در ساختار فیلم شده است که علت آن نامحلول بودن اسانس‌های گیاهی در آب است (Bonila *et al*., 2018). ولی ماهیت محلول در آب هیدروسل این تغییرات را در بافت فیلم ایجاد نمی‌کند (Labaddie *et al*., 2016).



شکل 3- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نمونه فیلم ژلاتینی شاهد. سمت راست تصاویر سطحی و سمت چپ تصاویر مقطع عرضی.

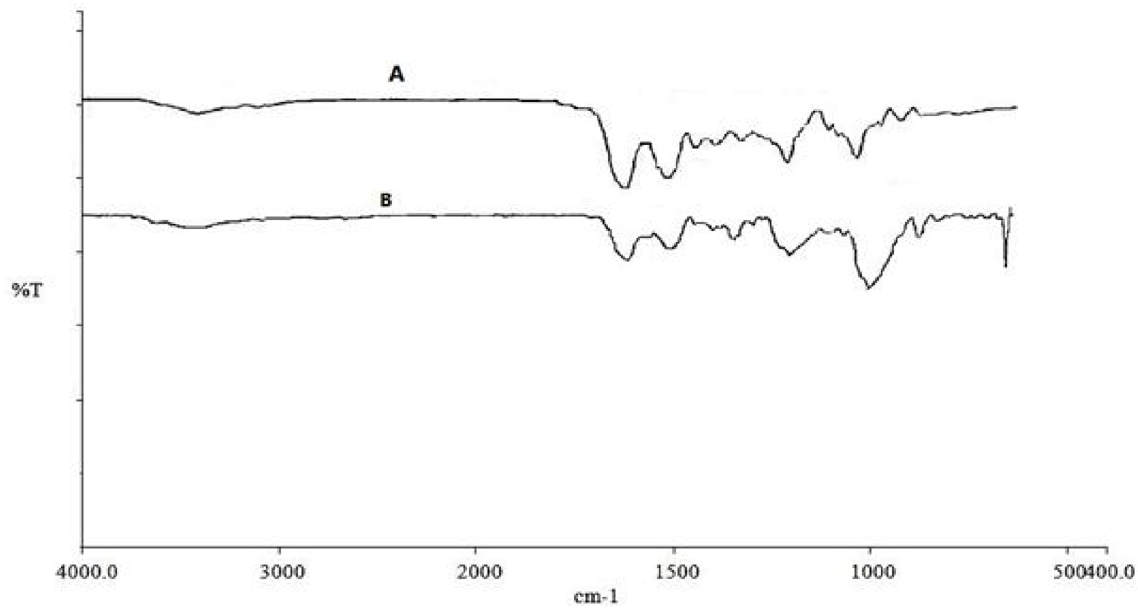


شکل 4- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نمونه فیلم ژلاتینی حاوی 100% هیدروسل زردچوبه. سمت راست تصاویر سطحی و سمت چپ تصاویر مقطع عرضی

طیف سنجی مادون قرمز فوریه

به‌منظور بررسی برهم کنش‌ها و پیوندهای موجود در نمونه‌های فیلم ژلاتینی، طیف سنجی مادون قرمز فوریه بر روی نمونه شاهد و نمونه حاوی هیدروسل زردچوبه انجام شد.

طیف‌سنجی مادون قرمز فوریه مربوط به فیلم ژلاتینی شاهد نشان داد که یک پیک در طول موج $1036\ cm^{-1}$ وجود دارد که این پیک احتمالاً مرتبط با وجود پلاستی‌سایزر گلیسرول در ساختار فیلم ژلاتینی و وجود گروه هیدروکسیل مربوط به گلیسرول است و تشکیل پیوند هیدروژنی بین این گروه هیدروکسیدی با ساختار فیلم خوراکی ژلاتین است. پیک ایجاد شده در طول موج $1239\ cm^{-1}$ مربوط به آمین حلقوی اولیه و پیوند C-N آمید نوع سوم است. پیک در طول موج $1452\ cm^{-1}$ مربوط به OH در ساختار ژلاتین است. پیک $1630\ cm^{-1}$ مربوط به پیوندهای C=C و C=O می‌باشد (Bonilla *et al.*, 2018). افزودن هیدروسل سبب ایجاد تغییراتی در طیف مادون قرمز فیلم ژلاتینی می‌گردد.



شکل5- طیف‌سنجی مادون قرمز فوریه. A: نمونه شاهد B: فیلم ژلاتینی حاوی 100% هیدروسل زردچوبه.

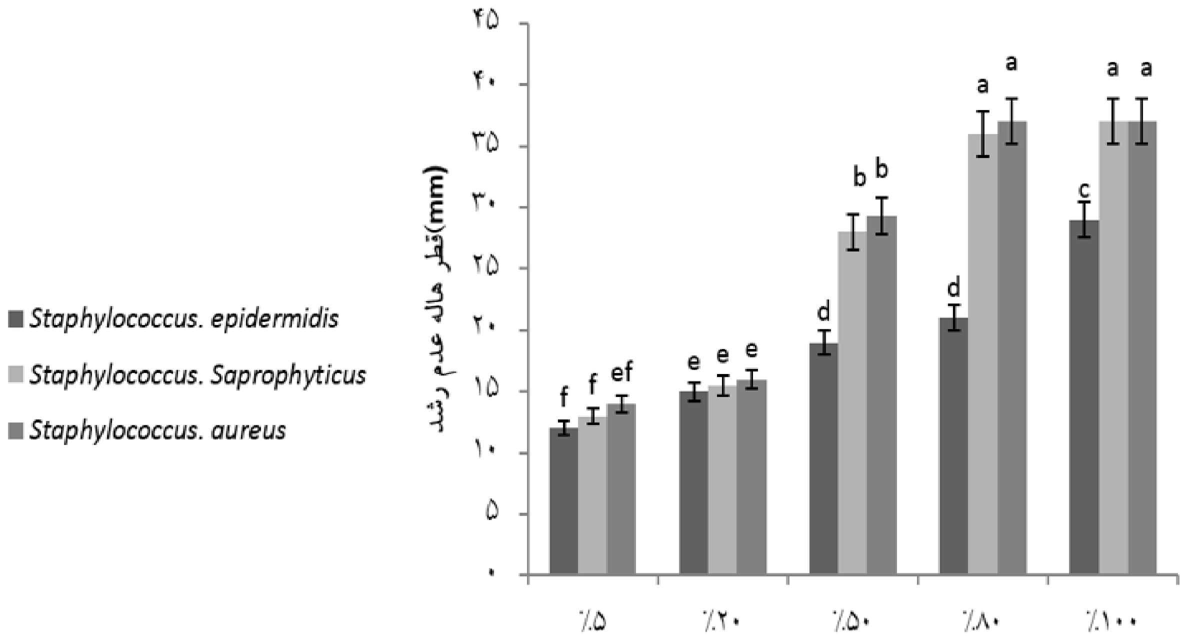
در فیلم ژلاتینی حاوی هیدروسل زردچوبه، پیک ایجاد شده در $1500cm^{-1}$ مربوط به پیوندهای آروماتیک C-C است. (Goni *et al.*, 2016). سایر پیک‌های مشاهده شده در طیف مادون قرمز فوریه مربوط به فیلم ژلاتینی حاوی هیدروسل شامل پیک‌های ظاهر شده در طول موج 3500 مربوط به پیوندهای CO-H ، طول موج $1500cm^{-1}$ مربوط به پیوندهای C-C، پیک طول موج $913\ cm^{-1}$ مربوط به پیوندهای $C-CH_2$ است (Bonilla *et al.*, 2018). ظاهر شدن پیک در طول موج $680\ cm^{-1}$ مربوط به ترکیبات آروماتیک و حلقوی است (Schwartz. 2008) ظاهر شدن این پیک در فیلم ژلاتینی حاوی هیدروسل زردچوبه می‌تواند مربوط به وجود ترکیبات آروماتیک و حلقوی در هیدروسل زردچوبه باشد. وجود انواع ترکیبات آروماتیک در هیدروسل‌های مختلف گیاهی گزارش شده است(Labadie *et al.*, 2016).

بررسی خاصیت ضدمیکروبی فیلم ژلاتینی

نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضدمیکروبی فیلم ژلاتینی در شکل 6 نشان داده شده است. سه گونه *استافیلوکوکوس* مورد بررسی، حساسیت متفاوتی نسبت به فیلم‌های ژلاتینی حاوی هیدروسل استخراجی زردچوبه نشان دادند به‌طوری که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* بود ($p\leq0/01$). *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* نیز به فیلم‌های ژلاتینی حاوی هیدروسل زردچوبه حساسیت مشابهی نشان داد ولی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، مقاومت بیشتری نسبت به فیلم ژلاتینی حاوی زردچوبه داشت به طوری‌که در غلظت‌های کمتر از 100%، قطر هاله رشد کمی ایجاد شد (شکل 6).

زردچوبه جزء یکی از گیاهان غنی از ترکیبات پلی‌فنلی می‌باشد. این گیاه دارای طیف گسترده از اثرات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی نظیر آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی است که عمده این خواص به ترکیبات پلی‌فنل موجود در زردچوبه نسبت داده شده است. از جمله

مهم‌ترین این ترکیبات، ترکیبات کورکومینوئیدی موجود در گیاه زردچوبه است (بهرامی و همکاران، 1392).



شکل 6- قطر هاله عدم رشد (mm) در فیلم‌های ژلاتینی حاوی درصد مختلف هیدروسل استخراجی زردچوبه .

اثرات ضدمیکروبی هیدروسل استخراجی گیاهان مختلف گزارش شده‌اند. هیدروسل بهارنارنج در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژنوزا*، *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا انتریکا*، *باسیلوس سرئوس*، *کاندیدا آلبیکانس* ، *آسپرژیلوس براسیلینس* بررسی گردیده و مشخص شده است اثر بازدارندگی بر این میکروارگانیسم‌ها داشته است (Labadie *et al*., 2016). هیدروسل استخراجی گیاه *Nepeta nepetella* اثر ضدمیکروبی قوی در برابر *کلبسیلا پنومونی*، *انتروکوکوس فکالیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتلیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* نشان داده است. مطابق این پژوهش باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی نشان داده‌اند و *باسیلوس سرئوس* بیشترین حساسیت را نشان داده است (Bellahsene *et al*., 2015; Karampoula *et al*., 2016).

نتیجه‌گیری

هیدروسل استخراجی زردچوبه سبب ایجاد اثرات ضدمیکروبی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در فیلم ژلاتینی می‌گردد. استفاده از این نوع هیدروسل در ساختار فیلم ژلاتینی سبب کاهش نفوذ پذیری نسبت به بخار آب به میزان 28% گردید. خصوصیات مکانیکی فیلم ژلاتینی نیز تحت تأثیر هیدروسل قرار می‌گیرد به‌طوری که سبب افزایش تنش کششی و کاهش درصد کش آمدن می‌گردد. شفافیت نیز در فرمولاسیون فیلم ژلاتینی حاوی هیدروسل تا حدودی کاهش می‌یابد ولی میزان ممانعت نسبت به اشعه ماورابنفش، افزایش نشان داد. بررسی های میکروسکوپی یکنواختی بافت فیلم ژلاتینی حاوی هیدروسل را نسبت به نمونه شاهد نشان داد.

منابع

بهرامی م، افشاری ز، احمدی ف، محیطی م ج، جلالی خان آبادی ب، مرادی ع. ارزیابی محتوای پلی فنولی عصاره آبی الکلی زردچوبه در ایران با روش سینگلتون. *مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد*. 1392؛ 21(3): 281-290.

فلاح حسینی ح، زحمتکش م، حقیقی م. مروری بر کاربرد گیاه زردچوبه (*Curcuma longa L.*) در طب سنتی و مدرن. *فصلنامه گیاهان دارویی*. 1388؛ 9(1): 15-1.

محمدی ن، میر حسینی م، شیرزاد م، دهقان همدان ع، یزدانی کشکولی ن. سنتز نانوذرات اکسید روی با استفاده از روش آسیاکاری پرانرژی و بررسی خاصیت ضد میکروبی آن. *مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد*. 1394؛ 23 (4): 2082-2070.

مرادیان ایوری ع ا، صالحی م، ملک جعفریان م. اثر ضد میکروبی عصاره متانولی رزماری بر *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به ونکومایسین جدا شده از بیماران بیمارستان امام رضا در مشهد. *مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور* 1394؛ 3 (3): 45-39.

Alparslan, Y., Hasanhocao glu Yapıcı, H., Metin, C., Baygar, T., Günlü, A., Baygar, T. 2016. Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatin. *LWT - Food Science and Technology* 72 : 457-466.

ASTM (1995). Standard test method for water vapour transmission of materials. Standard designations: E96-95. Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials406–413.

ASTM. 2001. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882. ASTM, annual book of ASTM (pp. 162-170). *Philadelphia:* ASTM.

Bellahsene, C., Bendahou, M., Khadir, A., Zenati, F., Bendelaïd, F., Aissaoui, N., Muselli, A., Costa, J. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil and hydrosol extract of *Nepeta nepetella* subsp. amethystina (Poir.) Briq from Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015;5: 21-25.

Belabbes, R., El Amine Di, M., Djabou, N., Ilias, F., Tabti, B., Costa, J., Muselli, A. Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of *Calendula arvensis L.* from western Algeria. *Chemistry and Biodiversity*.2017; 14.

Bonilla, J., Poloni, T., Lourenço, R.V., Sobral, P.J.A. Antioxidant potential of eugenol and ginger essential oils with gelatin/Chitosan films. *Food Bioscience* 2018; 107-114.

D'Amato, S., Serio, A., Lopez, C. C., Paparella, A. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*. 2018; 86: 126-137.

Ghani, S., Barzegar, H., Noshad, M., Hojjati, M. The preparation, characterization and in vitro application evaluation of soluble soybean polysaccharide films incorporated with cinnamon essential oil nanoemulsions. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018; 112 197–202.

Goñi, M. L., Gañán, N. A., Strumia, M. C., & Martini, R. E. Eugenol-loaded LLDPE films with antioxidant activity by supercritical carbon dioxide impregnation. *Journal of Supercritical Fluids*. 2016; 111: 28–35.

Jamróz, E., Juszczak,L., Kucharek, M. Investigation of the physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of ternary potato starch-furcellaran-gelatin films incorporated with lavender essential oil. International *Journal of Biological Macromolecules* 2018; 114: 1094–1101.

Kaewprom, K., Chen, Y-H., Lin, CF., Ming-Tang Chiou, M.T., Chao-Nan Lin, C-N. Antiviral activity of *Thymus vulgaris* and *Nepeta cataria* hydrosols against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2017; 47(1): 25-33.

Karampoula, F., Giaouris, E., Deschamps, J., Doulgeraki, A. I., Nychas, G.-J. E& ,. Dubois-Brissonnet, F. Hydrosol of Thymbra capitata is a highly efficient biocide against biofilms of *Salmonella Typhimurium*: Real-time visualization of bacterial inactivation by CLSM. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016; 82:5309-5319.

Kim, H., Beak, S-E., Bin Song, K.B., Development of a hagfish skin gelatin film containing cinnamon bark essential oil. LWT - *Food Science and Technology* 2018; 96: 583–588.

Labadie, C., Cerutti, C., Carlin, F. Fate and control of pathogenic and spoilage micro-organisms in orange blossom (*Citrus aurantium*), and rose flower (*Rosa centifolia*) hydrosols. *Journal of Applied Microbiology*. 2016; 121:1568-1579.

Martuccia, J.F. Gendeb, L.B. Neiraa, L.M. Ruseckaite**.** R.A. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products* 2015; 71: 205–213

Nisara, T., Wanga,Z-C., Yanga,X., Tiana,Y., Iqbalb, M., Guoa, Y. Characterization of citrus pectin films integrated with clove budessential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties International *Journal of Biological Macromolecules* 2018; 106: 670–680

Ozturk, L., Tornuk, F., Caliskan-Aydigan, O., Zeki Durak, M., & Sagdiç, Ö. Decontamination of iceberg lettuce by some plant hydrosols. LWT- *Food Science and Technology* 2016; 74: 48-54.

Sazedul Hoque, Md., Benjakul, S., Prodpran, T. Properties of film from cuttlefish (Sepia pharaonis) skin gelatin incorporatedwith cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids* 2011; 25: 1085-1097.

Silveira Hornung P, Masisi K, Nkhata Malunga L, Beta T, Hoffmann Ribani R. Natural bioactive starch film from Amazon turmeric (Curcuma longa L.). *Polymer Bulletin* 2018; 75(10): 4735-4752.

Shahbazi.Y. Application of carboxymethyl cellulose and chitosan coatings containing *Mentha spicata* essential oil in fresh strawberries. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018; 112: 264–272.

Sharma, N., Jandaik, S., Kumar, S., Chitkara, M., Singh Sandhu, I. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of manganese- and iron-doped zinc oxide nanoparticles. *Journal of Experimental Nanoscience*.2015; 11(1): 54-71.

Shen, X., Chen, W., Zheng, Y., Lei, X., Tang, M., Wang, H., Song, F. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrosols from different parts of Areca catechu L. and Cocos nucifera L. *Industrial Crops and Products* 2017; 96: 110-119.

Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry* 2012; 134:1571-1579.

Tongnuanchan, P., Soottawat Benjakul, S., Prodpran, T. Structural, morphological and thermal behavior characterizations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants. *Food Hydrocolloids* 2014; 41: 33-43**.**

Tongnuanchan, P., Benjakul,S., Thummanoon Prodpran, T., Pisuchpen,S., Osako**.** K. Mechanical, thermal and heat sealing properties of fish skin gelatin film containing palm oil and basil essential oil with different surfactants. *Food Hydrocolloid*s 2016; 56: 93-107.

Wu, J, Sun,X., Guo,X., Ge,S., Zhang, Q. Physicochemical properties, antimicrobial activity and oil release of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil. *Aquaculture and Fisheries* 2017; 2: 185-192.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 4, Oct- Nov 2019, p. 453-463

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 4، مهر - آبان 1398، ص. 463-453

Investigation of mechanical, physical and antibacterial gelatin film incorporated by Turmeric (*Curcuma longa*) hydrosol

Z. Didar[1*]

Received: 2018.08.26
Accepted: 2019.04.14

Introduction: Nowadays, edible packaging founds great attention due to environmental issues related to synthetic packaging materials. Gelatin is one of the most commonly ingredients used in edible packaging formulation due to its good barrier properties against gases and UV irradiation. Addition of plant extracts or essential oils is one approach for confer antimicrobial activity to edible films. The aim of this study was to use different percentages (5-100%) of turmeric hydrosol in the formulation of edible gelatin films and assessing the various properties of the resulted film.

Materials and methods: Extraction of turmeric hydrosol was done by Clevenger apparatus. Separation of the essential oil from hydrosol was done by a separating funnel. For preparation of gelatin films, 4g gelatin was dissolved in 100ml distilled water, and glycerol as plasticizer was added at ratio of 25w/w gelatin. In gelatin films included turmeric hydrosol, substitution of turmeric hydrosol instead of distilled water in the ratio of 5-100% was performed. Then, the mixture was poured in plexiglass plates (80×120 mm) and dried at 22ºC, 50% RH for 48h.Texture analysis was carried out using the texture analyzer TA-XT plus. The water vapor permeability (WVP) was measured using gravimetrically method. Light transmission was determined by spectrophotometer jenway 6305 at 200-800 nm wavelength. Morphological assessment was performed by scanning electron microscope (phenom proX). For Fourier-transform infrared spectroscopy analysis, Perkin-Elmer (Spectroma2 model) at 4000-4500 cm^{-1} frequency, used. Antimicrobial test was done by measurement inhibitory zone (mm) of edible films against *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112), *Staphylococcus saprophyticus* (PTCC 1440) and *Staphylococcus epidermium* (PTCC 1435).

The studied bacteria (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermium*) were purchased from the Iranian Scientific and Industrial Research Center and transferred to the suitable medium in sterile condition and incubated at 37°C for 32 hours. Microbial cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm. For the estimation of microbial population, McFarland turbidity method was applied. First, the results from comparing turbidity showed the population of microorganisms was equal to 0/5 McFarland solution (approximately $1/5×10^8$ CFU/ml), then for reaching to the desired microbial population ($1/5 \times 10^6$ CFU/ml), dilution with physiological saline was done. Agar disc diffusion method was used for assessing the antimicrobial effect of the gelatin films.

Gelatin films were cut into a 10mm diameter in aseptic condition using a circular knife and then placed on agar plates inoculated with 100µL of tested bacteria (with approximately 10^6 CFU/mL). The plates were then incubated (37ºC, 24h). The diameter of the inhibition zone was precisely measured using a digital micrometer (Guanglu model 701-211). Each experiment was performed triplicate.

Results and discussion: The results of this study showed that the use of turmeric hydrosol causes significant difference on mechanical and physical properties of related gelatin films ($p \leq 0.01$). The stress tension was increased by adding hydrosol to the edible film formulation, but the elongation percentage of the edible film decreased. The highest the stress tension was observed in sample containing 100% hydrosol (33.3 Mpa) but the lowest elongation percentage also was belong to this sample (96%). Addition of hydrosol to film formulation cause increasing of UV-radiation barrier property and reducing the transparency of the film. FTIR analysis of gelatin films included turmeric hydrosol, exhibited the existence of aromatic bonds according to appearing peak at 680cm^{-1}.

Structural studies by SEM method, showed uniformity in the structure of different gelatin films and hydrosol addition cause minor changes in the structure of films. The water vapor permeability was influenced by the edible film formulation and by adding different percentages of turmeric hydrosol, the permeability to water vapor, decreased ($p \leq 0.01$).Thickness was also affected by gelatin formulation and hydrosol caused reduction the thickness. Antimicrobial assessments showed that the addition of turmeric hydrosol cause inhibitory effects against studied *staphylococcus* strains. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* showed the highest susceptibility to hydrosol included films (inhibition zone equal to 37 mm for gelatin film included 100% turmeric hydrosol).

Keywords: Hydrosol, Turmeric, Packaging, Antimicrobial activity.

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Azad University, Neyshabur
(* Corresponding author E-mail: zdidar57@gmail.com)